

## INTRODUCTION

- Les virus de la famille Geminiviridae ont un génome à ADN simple brin circulaire répliqué par des ADN polymérases de l'hôte, réputées fidèles.
- Pourtant la fréquence de mutation détectée chez ces virus serait aussi élevée ( $10^{-4}$ ) que celle des virus à ARN qui se répliquent avec leur propre polymérase peu fidèle (Isnard et al. 1998, Ge et al. 2007).
- L'évolution du phénotype des géminivirus par mutation pourrait donc être rapide.**
- La détection des mutants et leur phénotypage passe par l'obtention de clones infectieux.
- Dans le cas du TYLCV qui n'est pas transmis mécaniquement, cela nécessite 2 étapes de clonage fastidieuses dans un plasmide d'*Agrobacterium tumefaciens*.
- Nous avons créé un vecteur universel permettant d'obtenir des génomes agroinoculables en une seule étape de clonage.

## Objectifs :

- Détermination de la fréquence de mutants, 36 jours après inoculation d'une plante de tomate par un clone de TYLCV
- Comparaison des phénotypes de 4 mutants à celui du clone parental



Fig. 1 : Symptôme de TYLC sur tomate

## MATERIEL ET METHODES

### Construction du plasmide universel pGreen-SL-NotI (Fig. 2)

- Insertion dans un plasmide d'*A. tumefaciens* (pGreen) d'un site unique de clonage NotI et d'une région de 40 nucléotides très conservée chez les begomovirus comprenant l'origine de réplication (stem-loop, SL).
- Création d'un site unique NotI sur le génome TYLCV modèle (TYLCV-NotI). Une seule copie de ce génome, cloné dans le plasmide pGreen-SL-NotI, est infectieuse.

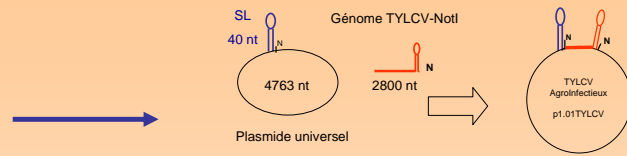


Fig.2 Stratégie de construction d'un clone infectieux à l'aide d'un plasmide universel

### Fréquence de mutation

- Une plante de tomate var Nainemor a été agro-inoculée avec TYLCV-NotI.
- 36 jours après, l'ADN viral a été isolé et 14 génomes entiers ont été clonés sans étape d'amplification PCR préalable dans le plasmide pGreen-SL-NotI.
- Estimation de la fréquence de mutation sur la base des séquences des 14 génomes complets.

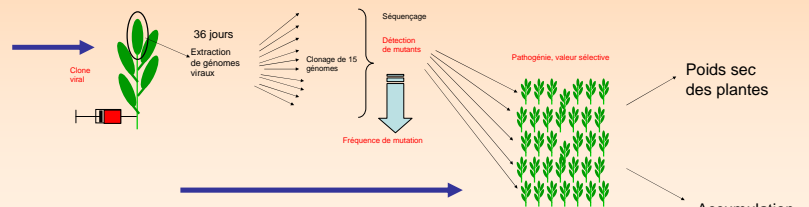


Fig.3 Mesure de la fréquence de mutation et impact des mutations sur le pouvoir pathogène

### Impact sur le pouvoir pathogène

- Le pouvoir pathogène de 4 mutants a été testé en parallèle avec le TYLCV parental sur 20 plantes de tomate chacun (Fig. 3).
- Estimation de la valeur sélective: Accumulation virale in planta à 15, 25 et 35 jours après inoculation par qPCR en prenant le gène d'actine 2 comme gène de référence
- Estimation de la virulence: mesure du poids sec 60 jours après inoculation (jpi)

## RESULTATS-DISCUSSION

- 14 génomes entiers (2,8kb) ont été clonés sans amplification PCR à partir de la plante infectée par le clone de TYLCV.
- 5/14 génomes sont mutés et portent chacun une seule mutation (Fig.4). Les mutations sont détectées dans les gènes V1, C1, C3 et dans la région intergénique (IR).
- La fréquence de mutation est estimée à  $1.38 \cdot 10^{-4}$  mutations/nt après 36j de réplication in planta

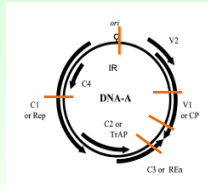


Fig. 4 : Position des 5 mutations virales générées durant un cycle d'infection de 36 jours dans une plante infectée par un clone de TYLCV

### Les 4 clones mutants testés sont infectieux sur tomate 12 à 14 plantes ont été infectées par clone

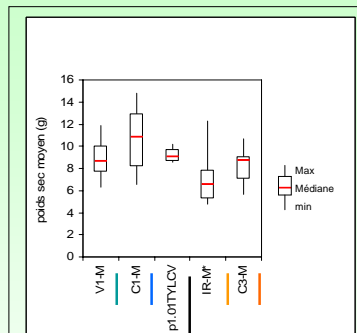


Fig. 5: Effet de la mutation sur le poids sec

- Le facteur mutation a un effet significatif sur la biomasse
- Effet significatif de la mutation IR sur la biomasse (ANOVA avec "R",  $p=7 \times 10^{-4}$ )

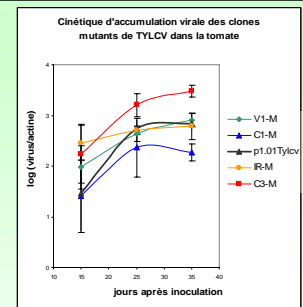


Fig. 6 : Effet de la mutation sur l'accumulation d'ADN viral.

Le facteur mutation a un effet significatif sur l'accumulation d'ADN viral

- Le mutant C3 accumule plus d'ADN viral à 35 jpi ( $p=3 \times 10^{-5}$ )
- Le mutant IR-M accumule plus d'ADN viral à 15 jpi (0.032).
- M-C1 accumule moins de virus 35 jpi ( $p=2 \times 10^{-4}$ )

## CONCLUSIONS

- Stratégie simplifiée d'obtention de clone infectieux
- 14 génomes entiers de TYLCV clonés sans étape d'amplification PCR, malgré une charge virale très faible dans la plante (limité au phloème).
- Apparition rapide de mutants de TYLCV présentant une valeur sélective et/ou une virulence plus élevées que le clone parental.
- Confirmation de la faible fidélité des polymérases de l'hôte pour la réplication des géminivirus

## PERSPECTIVES

Génotypage et phénotypage à haut débit de mutants et recombinants naturels ou artificiels pour des études d'évolution virale.

### Références bibliographiques

- Isnard M, et al. (1998). Quasispecies nature of three maize streak virus isolates obtained through different modes of selection from a population used to assess response to infection of maize cultivars. J. Gen. Virol. 79, 3091-3099.
- Ge LM, et al. (2007). Genetic structure and population variability of tomato yellow leaf curl China virus. Journal of Virology, 81:5902-5907.
- Urbino C, et al. (2008). A novel cloning strategy for isolating, genotyping and phenotyping genetic variants of geminiviruses. J. S. 135. doi: 10.1186/1743-422X-5-135.